

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara eksperimental laboratoris. Dalam penelitian ini mempunyai beberapa tahapan yaitu: determinasi sampel, ekstraksi sampel dengan pelarut etanol 70%, pemekatan sampel menggunakan *rotary evaporator*, uji kualitatif menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT sedangkan uji kuantitatif menggunakan KCKT.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan september sampai dengan februari 2014. Analisis dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Penelitian Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. Surat izin laboratorium penelitian terdapat pada *Lampiran 1*.

C. Populasi dan Sampel

Populasi sampel penelitian diambil dari Pakem Kaliurang, Sleman, Yogyakarta.

D. Identifikasi Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel

- a. Variabel bebas : Ekstrak kering kulit delima putih (*Punica granatum L.*)
- b. Variabel tergantung : Kadar kandungan tanin

c. Variabel terkontrol : Larutan *folin-ciocalteu* dan sistem KCKT

2. Definisi Operasional Variabel

a. Ekstraksi kulit delima putih (*Punica granatum L.*): pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam serbuk simplisia buah delima putih dalam larutan penyari etanol 70% dan digojok selama 15 menit. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 5 hari dan dilanjutkan remaserasi kembali dengan penyari yang sama selama 24 jam. Filtrat jernih yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental.

b. Kadar tanin: persen tanin yang diperoleh dari ekstrak etanol pada kulit delima.

c. Sistem KCKT yang digunakan:

KCKT	: Shimadzu
Fase diam	: Kolom C-18 (250 x 4.6 mm)
Fase gerak	: Asam Fosfat 0,55% (v/v)
Kecepatan alir	: 1,5 mL/menit
Volume injeksi (<i>loop</i>)	: 20 µL
Elusi	: Isokratik.
Detektor	: UV 277 nm

E. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa alat-alat gelas (Pyrex[®]) yang lazim digunakan, batang pengaduk, cawan petri, freezer (Sanyo[®] freezer HF-S6L), kertas saring, kompor listrik, labu erlenmeyer, mikropipet ukuran 100 – 1000 μ L dan 10 – 100 μ L (Acura[®] manual 825), tabung reaksi, saringan (Corong Buchner), sentrifuge (K-Centrifuge[®] plc series PLC-05), sonikator (Elmasonik S30 H[®]), spektrofotometer (Simadzu[®] UV-1800), detektor UV-Vis (Simadzu[®] SPD-20A Uv-Vis), *syringe membrane filter* 0,22 μ m, system alat KCKT (Simadzu[®] AD30), kolom fase diam KCKT (Simadzu[®] Shim-pack VP-ODS 250L x 4,6 μ m), timbangan digital (AND GR-202), *vacum rotary evaporator* (IKA[®] RV10), vortex (Labinco L46[®]), dan *water bath*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa: kulit kering buah delima putih (*Punica granatum* L.) yang sudah dideterminasi di Laboratorium Unit II Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada (*terlampir 2*), asam fosfat 85% (Merck), aquabidest (Ostuka), etanol 70% (ekstraksi) Bratachem[®] / *grade* teknis, follin (Merck), methanol gradient grade for liquid chromatography (Merck), natrium karbonat (Merck), tanin (Sigma).

F. Cara Kerja

1. Pengumpulan Bahan

Buah delima putih (*Punica granatum* L.) segar diperoleh dari perkebunan Sabila farm, Jl. Kaliurang Km.18,5 Pakem, Sleman, Yogyakarta. Setelah itu dilakukan pencucian untuk menghilangkan debu yang melekat pada kulit buahnya.

2. Determinasi Tanaman

Sebelum dimulainya penelitian, perlu dipastikan bahwa tanaman yang digunakan yaitu buah delima putih sudah benar, sehingga perlu dilakukan determinasi tanaman di bagian Biologi Farmasi Unit II Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Tanaman dideterminasi dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi delima putih (*Punica granatum L.*) yang ada dengan aturan-aturan yang diberikan oleh Backer dan Van Den Brink dalam buku *Flora of Java (Spermatophytes Only)*.

3. Preparasi Sampel Kulit Buah Delima Putih Kering

Kulit buah delima putih dicuci bersih, dibelah dan di ambil kulit buah lalu dikering anginkan selama 1 minggu dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam. Setelah kering kulit delima diblender hingga menjadi serbuk.

4. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

Dalam penelitian ini pembuatan ekstrak dilakukan menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam serbuk simplisia buah delima sebanyak 150 gram dan 750 ml etanol 70% ke dalam bejana kaca dan diaduk sampai homogen. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung bahan zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat akan didesak ke luar. Proses maserasi ini dilakukan selama 5 hari dan digojok setiap pagi, siang dan sore. Hari ke-5, dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel. Selanjutnya

ampas dan filtrat jernih dipisahkan. Ampas ini diremaserasi kembali dengan penyari yang sama selama 24 jam. Setelah itu Filtrat jernih hasil maserasi dan remaserasi yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental. Tuangkan dalam cawan porselin, dipanaskan dengan kompor listrik dan dibantu dengan kipas angin sambil terus diaduk juga suhu tetap di kontrol dengan termometer. Proses ini untuk menguapkan etanol sehingga diperoleh ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.

Ekstrak kering yang didapat dihitung perolehan rendemen dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot akhir sampel (ekstrak)}}{\text{bobot sampel (simplisia)}} \times 100\%$$

5. Analisis Kualitatif Tanin dengan Metode *Folin-Ciocalteu*

a. Larutan Folin

Larutan folin diambil sebanyak 1 ml. Kemudian ditambahkan aquabidest hingga volume 10 ml dan sonikasi hingga homogen.

b. Larutan Na₂CO₃

Na₂CO₃ ditimbang seksama sebanyak 7,5 gram. Kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga volume 100 ml dan sonikasi hingga homogen.

c. Uji Kualitatif Tanin dengan Larutan *Folin-Ciocalteu*

Disiapkan 2 tabung reaksi bersih dan kering, dimana satu untuk standar dan satu untuk sampel. Tabung pertama dimasukkan 300 µL larutan standar tanin kadar 1000 µg/mL dan tabung kedua diisi 300 µg/mL sampel

1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tambahkan pada masing-masing tabung 1,5 mL larutan folin (point a). Gojog dan didiamkan selama 3 menit. Kemudian ditambahkan kembali masing-masing tabung 1,2 mL larutan Na_2CO_3 . Gojog dan didiamkan. Amati perubahan warna yang terjadi (*positif tanin jika warna biru*).

6. Analisis Kualitatif, Kuantitatif dan Penetapan Kadar Tanin dengan Metode KCKT

a. Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Pembuatan fase gerak sejumlah 500 ml, dengan cara mengukur 3,24 mL asam fosfat 85% menggunakan mikropipet kemudian menambahkan aquabidest hingga 500 mL. Selanjutnya larutan dihomogenkan dengan bantuan sonikator selama 15 menit.

b. Pembuatan Larutan Baku Standar Tanin

Standar tanin ditimbang seksama 10,0 mg, dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan dalam aquabidest hingga tanda tera (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Larutan tersebut disonikasi selama 15 menit dan disaring dengan *membrane filter* 0,22 μm . Diperoleh konsentrasi larutan baku standar tanin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

c. Pembuatan Larutan Seri Baku Tanin

Dibuat larutan seri baku tanin dengan cara memipet 10; 20; 30; 40; dan 50 μL masing-masing ke dalam labu takar 5 mL, kemudian diencerkan secara kuantitatif dengan aquabidest sampai tanda tera, sehingga diperoleh

konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Setelah itu sebanyak 20 μL diinjeksikan masing-masing larutan ke dalam sistem KCKT.

d. Penentuan Panjang Gelombang Pengukuran Baku Standar Tanin

Penentuan panjang gelombang pengukuran baku standar tanin dibuat menggunakan spektrofotometer UV antara panjang gelombang 200 – 400 nm. Diambil sebagian larutan baku standar tanin dan dimasukkan kedalam kuvet lalu dilakukan *scanning* dengan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200 - 400 nm, sehingga diperoleh spektrum serapan dan panjang gelombang maksimum tanin. Nilai panjang gelombang maksimum yang diperoleh diset sebagai panjang gelombang deteksi pada sistem KCKT.

e. Kondisi KCKT untuk Penetapan Kadar Tanin

Sistem KCKT yang digunakan mengacu pada Zhongkui *et al* (2001) adalah sebagai berikut:

KCKT	: Shimadzu
Fase diam	: Kolom C-18 (250 x 4.6 mm)
Fase gerak	: Asam Fosfat 0,55% (v/v)
Kecepatan alir	: 1,5 mL/menit
Volume injeksi (<i>loop</i>)	: 20 μL
Elusi	: Isokratik.
Waktu Retensi	: 25,0 menit
Detektor	: UV 277 nm

Setelah itu dilakukan pembilasan sistem dengan fase gerak selama 10 menit dengan kecepatan alir 1,5 mL/ menit, kemudian dihubungkan kolom dengan detektor. Selanjutnya diinjeksikan sampel sebanyak (20 μ L) dan dilihat kromatogram hasil elusi dan waktu retensi yang diperoleh.

f. Analisis kurva baku dan sampel dengan Kromatografi Cair

Kinerja Tinggi (KCKT)

Sejumlah 20 μ L larutan kurva baku dan sampel diinjeksikan dalam alat KCKT. Larutan kemudian dibawa masuk ke dalam kolom oleh aliran fase gerak yang dialirkan dengan tekanan dari pompa. Di kolom inilah larutan dianalisis kadarnya.

Running larutan kurva baku dan sampel dilakukan selama 10 menit dengan panjang gelombang hasil *scanning*. Dari analisis ini, didapatkan data berupa kromatogram yang menggambarkan luas area kurva baku. Selanjutnya data tersebut diolah dengan metode regresi linier.

g. Linearitas

Untuk menentukan linearitas metode analisis dibuat suatu seri baku tanin dengan konsentrasi larutan baku tanin 2, 4, 6, 8 dan 10 μ g/ mL. Masing-masing larutan diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke alat KCKT dan direplikasi sebanyak 3 kali. Dari kromatogram akan diperoleh luas area dan tinggi puncak tanin untuk tiap konsentrasi dan kemudian diplotkan dengan konsentrasi larutan baku tanin. Dari kurva hubungan antara tanin dengan luas area dan tinggi puncak dapat diperoleh nilai koefisien korelasinya. Nilai koefisien korelasi merupakan parameter linearitas

metode. Linearitas akan semakin baik apabila nilai koefisien korelasinya semakin mendekati satu. Koefisien korelasi suatu metode analisis yang semakin mendekati satu menggambarkan suatu hubungan yang semakin kuat antara variabel bebas dengan variabel tergantung (Freska,2008). Dalam analisis, kurva kalibrasi sering dituntut menghasilkan nilai lebih besar dari 0,999. Persamaan garis $y = bx + a$ yang diperoleh juga digunakan untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantifikasi (Miller dan Miller, 1988). Nilai r belum dapat mengindikasikan linearitas, kecuali bila nilainya lebih besar dari 0,999 atau memiliki koefisien korelasi fungsi (V_{xo}) yang lebih kecil dari 5%. Apabila nilai r yang didapat lebih kecil dari 0,999 maka dibutuhkan parameter lain untuk menilai parameter tersebut. Parameter lain tersebut adalah koefisien variasi fungsi (V_{xo}) (Yuwono & Indrayanto, 2005).

h. Penetapan Kadar Kulit Buah Delima

Sebanyak 10,0 mg sampel ekstrak ditimbang seksama dan dilarutkan dalam 10 mL aquabidest. Larutan tersebut disonikasi selama 15 menit dan disaring dengan *membrane filter* 0,22 μm . Diperoleh konsentrasi larutan baku standar tanin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dipipet 300 μL larutan sampel tersebut menggunakan *micropipette* kemudian ditambahkan 700 μL aquabidest. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm. Sampel disuntikkan sebanyak 20 μL ke sistem KCKT, kemudian dicatat luas puncaknya. Percobaan direplikasi sebanyak 3 kali. Kadar tanin dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva kalibrasi.